



## KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11) Publication number: 1020000033008 A  
(43) Date of publication of application: 15.06.2000

(21) Application number: 1019980049663

(71) Applicant:

KOREA GREEN CROSS  
CORPORATION  
KOREA INSTITUTE OF  
SCIENCE AND TECHNOLOGY

(22) Date of filing: 19.11.1998

(72) Inventor:

HONG, HYO JEONG  
HUH, HYANG SUK  
RYU, CHUN JE

(30) Priority: ..

(51) Int. Cl C12N 15/51  
C12N 15/62

(54) PREPARATION OF HUMANIZED ANTIBODY ON SURFACE ANTIGEN PRE-S1 OF HEPATITIS B VIRUS

(57) Abstract:

PURPOSE: Humanized antibody on surface antigen pre-S1 of hepatitis B virus (HBV) is provided which is derived from mouse monoclonal antibody (KR 127). The humanized antibody maintains the affinity on the antigen but decreases the antigenicity of mouse antibody on the human body by changing amino acid residues specific for mouse into human specific one. CONSTITUTION: Humanized variable region of heavy chain is derived from variable region of heavy chain of human antibody DP7 substituted into mouse framework residues and complementarity-determining region (CDR)1 and 3, and part of 2. Complete humanized heavy chain is constructed by joining leader sequence for secretion, constant region of heavy chain from pRC/CMV-HC-HuS, and humanized variable region. Humanized variable region of light chain is derived from variable region of light chain of human antibody DPK12 substituted into mouse framework residues and complementarity-determining region (CDR)1, 2, and 3. Complete humanized light chain is constructed by joining leader sequence for secretion, constant region of heavy chain from pKC-hr-HuS, and humanized variable region. Each complete chain is cloned into expression vector, pRC/CMV, and transfected into COS7 cell for the production of antibody.

COPYRIGHT 2000 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (19981119)

Notification date of refusal decision ( )

Final disposal of an application (registration)

Date of final disposal of an application (20020516)

Patent registration number (1003454630000)

Date of registration (20020709)

Number of trial against decision to refuse ( )

Date of requesting trial against decision to refuse ( )

Date of extinction of right ( )

## (19) 대한민국특허청(KR)

## (12) 공개특허공보(A)

(51) int. Cl.<sup>6</sup>

C12N 15/51

C12N 15/62

(21) 출원번호 10-1998-0049663

(22) 출원일자 1998년 11월 19일

(71) 출원인 주식회사 녹십자 허일선

경기도 용인시 기흥읍 구갈리 227번지 한국과학기술연구원 박호군

서울특별시 성북구 하늘곡동 39-1

홍호경

대전광역시 유성구 가정동 237 KIT아파트 15동 401호

류준재

대전광역시 유성구 어은동 99 한빛아파트 136동 1203호

허향숙

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 106동 1508호

(74) 대리인 이원희

설명(구) : 임을(54) B형 간염바이러스의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화항체 및이의 제조방법요약

본 발명은 B형 간염바이러스 (hepatitis B virus, 이하 "HBV"로 약칭함)의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체 (humanized antibody)에 관한 것으로, 구체적으로 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 생쥐 단일클론 항체 KR127의 가변영역과 가끔 유사한 사람 항체유전자를 선택하고 이를 대상으로 인간화 항체의 중쇄 (heavy chain) 유전자, 이를 포함하는 밀현 벡터, 상기 밀현 벡터로 형질전환된 항체유전자체, 그리고 상기 형질전환체를 배양하여 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체를 제조함으로써, 본원 발명의 인간화 항체는 생쥐 단일클론항체 KR127와 유사한 항원결합능을 유지하면서도 KR127보다 생쥐 유래의 아미노산 전기가 많이 감소되어 인체에서 면역유발능의 감소가 기대되는 바, HBV 감염의 예방과 B형 만성간염의 치료에 효과적으로 이용할 수 있다.

대표도도 1형세서도면의 간단한 설명

도 1은 HBV 표면항원 프리-S1에 대한 생쥐 단일클론 항체 KR127 및 인간화 항체 중쇄의 아미노산 서열 및 엔기 서열을 비교하여 나타낸 것이고,

도 2는 HBV 표면항원 프리-S1에 대한 생쥐 단일클론 항체 KR127에 대한 인간화 항체의 중쇄 유전자 HKR127HC를 얻는 과정을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 3은 HBV 표면항원 프리-S1에 대한 생쥐 단일클론 항체 KR127 및 인간화 항체의 아미노산 서열 및 엔기 서열을 비교하여 나타낸 것이고,

도 4는 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 생쥐 단일클론 항체 KR127에 대한 인간화 항체의 경쇄 유전자 HKR127KC를 얻는 과정을 개략적으로 나타낸 것이다,

도 5a는 본 발명의 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체의 중쇄 밀현 벡터 pCMV-HKR127KC를 나타낸 것이다.

도 5b는 본 발명의 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체의 경쇄 밀현 벡터 pKC-dhfr-HKR127을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 인간화 항체 HKR127의 항원 결합강도를 생쥐 단일클론항체 KR127과 비교하여 나타낸 것이다.

◇ : KR127 :

■ : HKR127

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체에 관한 것이다.

보다 상세하게는, HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 생쥐 단일클론항체 KR127의 가변영역과 가장 유사한 사람 항체유전자를 선별하고 이들을 대상으로 인간화 항체의 경쇄 (heavy chain) 유전자 및 경쇄 (light chain) 유전자, 이를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터로 항체를 전환하는 형질전환체, 그리고 상기 형질전환체를 배양하여 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

HBV는 인체에 침입하여 만성 및 급성 간염을 일으키며, 악화를 경유 간경화와 간암의 원인이 되는 병원체로, 전세계적으로 환자가 3억명에 이르는 것으로 추산하고 있다 (Trollais and Buendia, *Sci. Am.*, 264, 48, 1991). HBV의 피막은 3개의 단백질로 구성되는데, 구체적으로 S 항원을 포함하는 주 (major) 단백질, S 항원과 프리-S2 항원을 포함하는 중 (middle) 단백질 및 S 항원, 프리-S2 항원과 프리-S1 항원을 포함하는 대 (large) 단백질로 구성된다 (Neurath, A.R. and Kent, S.B.H., *Adv. Virus Res.*, 34: 65-142, 1988). 이 모든 표면항원 단백질들은 HBV를 중화시키고 무력화하는 항체를 유도하며, 특히 프리-S 부위에 의해 유도되는 항체는 바이러스의 제거 및 급성 HBV 감염에서의 회복과 관련이 있고 S항원에 대한 무역반응 (Non-responsiveness)을 극복할 수 있다 (Iwarson 등, *J. Med. Virol.*, 16: 89-96, 1985; Itoh, 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9174-9178, 1986; Neurath 등, *Vaccine* 7: 234-236, 1989; Budkowska 등, *J. Med. Virol.* 20: 111-125, 1988; Millich 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8168-8172, 1985; Millich 등, *J. Immunol.* 137: 315-322, 1986).

그 중 프리-S1 항원은 프리-S2 항원이나 S 항원과는 달리 감염성 바이러스 인자들 (Infectious virus particles)에 주로 존재하고 (Heermann 등, *J. Virol.*, 52: 396-402, 1984), 사람 간세포의 감염에 관여하기 때문에, 프리-S1에 특이인 단일클론항체는 바이러스 중화에 매우 효과적으로 작용하여 (Neurath et al., *Cell*, 46, 429, 1986; Pontisso, et al., *J. Virol.*, 173: 533 1989; Neurath et al., *Vaccine*, 7, 234, 1989), HBV감염의 예방과 B형 만성간염의 치료에 유용할 것으로 생각된다.

HBV에 감염된 경우, 이를 들어 HBV 양성인 모친으로부터 태어나는 신생아나 HBV에 노출된 의료기관 종사자들 또는 HBV 관련 간접으로인 간접환자 등의 HBV 감염을 방지하기 위해 현재까지는 HB 예방으로 볼리 (이하 HBIG로 부르는 항체)를 사용하였다 (Beasley et al., *Lancet*, 2, 1099, 1983; Todo et al., *Hepatol.*, 13, 619, 1991). 그러나 현재 사용되고 있는 HBIG는 혈장으로부터 추출되기 때문에, 항원에 대한 특이성 (specificity)이 낮고, 제조과정 중 오염원에 노출될 우려가 있으며, 사람의 혈액을 계속 공급해야 한다는 문제점이 있다.

상기 문제점을 해결하기 위하여 생쥐의 HBV 표면항원에 대한 단일클론항체를 사용하는 방법이 개발되었다. 그러나 생쥐 단일클론항체는 일반적으로 항원에 대한 친화도가 높고 대량생산이 가능하지만, 사람에게 주사하였을 때에 체내에서 면역반응을 유발한다는 단점이 있었다 (Shawler et al., *J. Immunol.*, 135, 1530, 1985).

이에 상기 문제점을 해결하고자 사람의 단일클론항체를 사용하는 기술이 보고되었으나, 친화도가 높은 사람 단일클론항체의 생산기술의 상생기술은 적용되어 있지 않다.

대신 생쥐유래 단일클론항체의 높은 친화도와 특이성을 유지한 채 인체 내에서의 면역유발능을 최대한 줄일 수 있는 방법으로 “인간화 항체”가 개발되었다. 인간화 항체는 생쥐항체의 항원결합부위 (CDRs)를 인간 항체에 이식시킨 것으로, 유전학적으로 대량생산이 가능하고, 유전자의 대부분을 인간화하였으므로 인체 내에서의 면역반응을 대폭 줄일수 있는 장점이 있다 (Riechmann et al., *Nature*, 332, 323, 1988; Nakatani et al., *Protein Engineering*, 7, 435, 1994).

이에 본 발명자들은 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 생쥐 단일클론항체 KR127을 개발한 바 있고, KR127항체의 가변영역을 암호하는 유전자를 분리하고 그 염기서열을 결정한 바 있다 (대한민국 특허출원 제97-30696호).

본 발명에서는 상기 생쥐 단일클론항체 KR127로부터 인간화 항체를 제조하여 HBV 감염과 B형 만성간염의 치료에 이용하고자, KR127 항체의 경쇄 및 경쇄의 가변영역 서열과 가장 유사한 사람 유전자를 결합하고 이를 대상으로 인간화 항체의 경쇄 및 경쇄 유전자를 제조한 후 이를 발현벡터에 풀로닝하여 속주세포를 형질전환한 다음 이를 배양하여 인간화 항체를 얻어 생쥐 단일클론항체 KR127과 유사한 항원결합능을 유지하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 HBV 표면항원 프리-S1에 대한 생쥐 단일클론항체 KR127로부터 항원결합능을 유지한 상태에서 생쥐 유래의 아미노산 전기를 대부분 인간화시켜 인체내에서의 면역반응 유발능을 감소시킨 HBV 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체를 제공하는 것이다.

### 발명의 구성 및 주제

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 생쥐 단일클론항체 KR127의 가변영역과 가장 유사한 사람 항체유전자를 선별하고 이를 대상으로 제조한 인간화 항체 및 이의 경쇄 또는 경쇄의 아미노산 서열을 제공한다.

또한 본 발명은 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 삼기 인간화 항체의 경쇄 및 중쇄 유전자를 제공한다.

본 발명은 삼기 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체의 경쇄 및 중쇄 유전자를 포함하는 밝힌 박터로 형질전환시킨 항질전환체를 배양하여 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체를 제조하는 방법을 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명에서는 서울 19의 아미노산 서열의 가변영역을 포함하는 인간화 중쇄로 된 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체 및 서울 20의 아미노산 서열을 포함하는 인간화 경쇄로 된 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체를 제공한다.

또한, 본 발명에서는 서울 19의 아미노산 서열의 가변영역을 포함하는 인간화 중쇄를 양조하는 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 중쇄 유전자 HKR127HC 및 서울 20의 아미노산 서열의 가변영역을 포함하는 인간화 경쇄를 양조하는 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 경쇄 유전자 HKR127KC를 제공한다.

또한, 본 발명에서는 삼기 유전자 HKR127HC를 포함하는 밝힌 박터 pC-MV-HKR127HC (기타번호: KCT05318P) 및 삼기 유전자 HKR127KC를 포함하는 밝힌 박터 pC-dhfr-HKR127 (기타번호: KCT05298P)를 제공한다.

또한, 본 발명에서는 밝힌 박터 pCMV-HKR127HC와 밝힌 박터 pC-dhfr-HKR127로 COS7 세포를 형질전환하여 얻은 형질전환체 HZIKR127를 제공한다.

또한, 본 발명에서는 삼기 형질전환체 HZIKR127를 배양하여 HBV 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체 HKR127의 제조방법을 제공한다.

본 발명에서는 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체를 제조하기 위하여, 우선 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 삼기 단일클론항체 KR127의 가변영역의 서열과 가장 유사한 사람 항체를 검색한다.

진뱅크 데이터 베이스 (GenBank data base)로부터 사람의 면역글로불린 생식세포주(germline) 유전자를 선별한 결과, DP70이 생쥐항체 KR127 중쇄의 가변영역의 유전자와 가장 유사한 사람 항체 유전자이고, DPK12가 생쥐항체 KR127 경쇄의 가변영역 유전자와 가장 유사한 사람 항체 유전자임을 확인하였다.

따라서 삼기 사람 항체 유전자 DP7, DPK12에 생쥐항체 KR127의 CDRs를 이식하여 본 발명의 인간화 항체의 경쇄 및 중쇄 가변영역 유전자를 제조한다.

본 발명에서는 인간화 항체의 경쇄 및 중쇄 가변영역 유전자를 제조하는 데 있어서, 항원결합부위에 해당하는 생쥐 항체의 중쇄와 경쇄의 CDRs은 대부분 생쥐항체 KR127의 것을 그대로 사용하였지만 항원결합부위에 영향을 주는 것으로 추정되는 아미노산은 비록 CDR장기자리라도 사람 항체의 아미노산으로 치환하였다. 또한 삼기 사람 항체 가변영역의 아미노산중에서 CDRs의 구조(conformation)에 영향을 미칠 프레임워크 (framework region, FR)의 및 아미노산 잔기들을 생쥐항체 KR127의 가변영역 아미노산으로 바꾸어 주었다.

구체적으로 인간화 항체의 중쇄 유전자를 제조하기 위하여, 삼기 생쥐 단일클론항체 KR127의 중쇄 가변영역 중에서 CDR1, 2, 3의 일부분 및 FR 장기 및 CDR 장기 및 서열을 사람 항체 중쇄 가변영역 DP70에 이식시켜 인간화 중쇄 유전자의 가변영역 HKR127HV(HZII)를 제조하였다(도 1 참조).

그러나 HKR127HV(HZII)를 사용하여 제조한 인간화 항체는 그 항원 결합능을 전혀 나타내지 않았다. 따라서 본 발명에서는 항원결합능을 유지시키기 위하여 생쥐항체 KR127의 아미노산 잔기를 더 많이 이식시킨 인간화 중쇄 유전자의 가변영역 HKR127HV(HZI)을 고안하였다(도 1 참조).

원전 같은 길이의 HKR127HV(HZI)를 제조하기 위하여, 삼기 새로운 인간화 중쇄 유전자의 가변영역 HKR127HV(HZI)와 중쇄의 리더 시퀀스(leader sequence) 및 사람항체 중쇄 γ1의 불변영역 서열을 갖고 있는 pC-MV-HC-Hs(HUS(KCT02268P))를 주형으로 하여 서울 1과 서울 2, 서울 3과 서울 4, 서울 5와 서울 6, 서울 7과 서울 8, 서울 9와 서울 10 그리고 서울 11과 서울 12의 시발체를 각각 이용하여 PCR을 수행한다(도 2 참조).

상기 서울 1과 서울 2, 서울 3과 서울 4, 서울 5와 서울 6, 서울 7과 서울 8, 서울 9와 서울 10에 의한 PCR 산물을 결합(annealing)시켜 이를 다시 주형으로 하여 서울 1과 서울 10의 시발체를 이용하여 제조한 PCR을 수행함으로 약 431bp의 단편을 얻는다. 이를 서울 11과 서울 12의 시발체를 각각 이용한 PCR 산물을 항주형으로 하여 서울 1과 서울 2, 서울 3과 서울 4, 서울 5와 서울 6, 서울 7과 서울 8, 서울 9와 서울 10 그리고 서울 11과 서울 12의 시발체를 각각 이용하여 PCR을 수행함으로 1431bp의 인간화 중쇄 유전자 HKR127HC를 얻어 pBluecript SK(+)에 클로닝하고 pHZIKR127HC를 명명하였다.

상기 인간화 중쇄 유전자를 합성하는 과정에 사용된 서울 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12의 시발체의 염기서열을 서울특별시에 나타내었다. 구체적으로 서울 1의 시발체는 그 말단에 제한효소 EcoRI 서열을 가지고 서울 12의 시발체는 그 말단에 제한효소 SalI 서열을 가지고 있다.

상기와 같이 제조된 인간화 중쇄 유전자 HKR127HC의 가변영역은 KR127 생쥐 항체의 가변영역 아미노산 잔기 15개를 사용 항체 DP7의 것으로 치환한 것을 양조하였다(도 1 참조).

또한 인간화 항체의 경쇄 유전자를 제조하기 위하여, 삼기 생쥐 단일클론항체 KR127의 경쇄 가변영역 중에서 CDR1,3의 전자와 CDR2 일부분을 사람항체 경쇄 DPK12에 이식시켜 인간화 경쇄 유전자의 가변영역 HKR127KC(HZII)를 제조하였다(도 3 참조).

그러나 HKR127KC(HZII)를 사용하여 제조한 인간화 항체는 그 항원 결합능을 전혀 나타내지 않았다. 따라서 항원결합능을 유지시키기 위하여 생쥐항체 KR127의 아미노산 잔기를 더 많이 이식시킨 인간화 경쇄 유전자 HKR127KC(HZI)를 고안하였다(도 3 참조).

원전 같은 길이의 새로운 인간화 경쇄 유전자 HKR127KC(H)를 제조하기 위하여 삼기 HKR127KC(HZII)와 경쇄의 리더 시퀀스(leader sequence) 및 사람항체 경쇄 κ의 불변영역 서열을 갖고 있는 pC-dhfr-Hs(KCTC

0230BP)를 주형으로 하여 서열 13와 서열 14, 서열 15와 서열 16 그리고 서열 17과 서열 18의 시발체를 각각 이용하여 PCR을 수행한다.

구체적으로 서열 13과 서열 14, 서열 15와 서열 16의 시발체를 각각 이용한 PCR 산물을 함께 주형으로 하여 서열 13과 서열 16의 시발체를 이용하여 PCR을 수행함으로 360bp 의 단본을 형성한다. 이를 다시 서열 17과 서열 18의 시발체를 이용한 PCR 산물과 함께 주형으로 하여 서열 13과 서열 18의 시발체를 이용하여 PCR을 수행함으로 739bp 의 인간화 경색 유전자 KR127KC를 얻어 pBluescript SK(+)에 클로닝하고 pKR127KC라 명명하였다.

상기 인간화 경색 유전자를 합성하는 과정에 사용된 서열 13, 14, 15, 16, 17, 18의 시발체의 염기서열은 서열 목록에 나타나 있다. 구체적으로 서열 13의 시발체는 그 말단에 제한효소 HindIII 서열을 가지고 서열 18의 시발체는 그 말단에 제한효소 Sall 서열을 가지고 있다.

상기와 같이 제조된 인간화 경색 유전자 KR127KC의 가변영역은 생성 단일클론형체 KR127 경색중 7개의 아미노산 잔기로 서열화형체 DPK12의 것으로 치환한 것을 암호한다(도 3 참조).

본 발명은 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체의 상기 경색 및 중쇄 유전자를 포함하는 발현벡터로 형질전환시켜 형질전환체를 양화하여 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체를 제조하는 방법을 제시한다.

HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체를 제조하기 위하여, 우선 본 발명에서는 상기 인간화 항체의 경색 및 중쇄 유전자를 포함하는 발현벡터를 제작한다.

구체적으로, 인간화 중쇄를 포함하는 상기 pKR127KC로부터 본 발명의 인간화 중쇄를 제한효소를 이용하여 분리한 다음 pMC/CMV(Invitrogen사 제품)에 삽입하여 본 발명의 인간화 중쇄 발현 플라스미드 pCMV-KR127KC를 제조하였다. 또한 인간화 경색을 포함하는 상기 pKR127KC로부터 본 발명의 인간화 경색을 제한효소를 이용하여 분리한 다음 본 발명자들이 개발한 비 있는 pCMV-dhfr (KCTC 8671P)에 삽입하여 본 발명의 인간화 경색 발현 플라스미드 pKC-dhfr-KR127을 제조하였다.

상기 발현벡터 pCMV-KR127KC 또는 pKC-dhfr-KR127로 대장균(*E. coli*) DH5  $\alpha$  군주를 각각 형질전환하여 대장균 형질전환체를 제조하고 이를 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자은행에 1998년 10월 17일자로 기탁하였다. (수록번호: KCTC0531BP, KCTC0529BP).

본 발명에서는 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체를 양화하기 위하여, 본 발명의 인간화 중쇄 및 인간화 경색 유전자를 포함하는 발현 벡터 pCMV-KR127KC 및 pKC-dhfr-KR127로 COS7 세포를 일시적으로 형질전환시켜 형질전환체 KR127을 얻은 다음 이를 배양하여 본원 발명의 인간화 항체를 분리한다.

상기와 같은 과정으로 얻어진 인간화 항체 KR127과 생성 단일클론형체 KR127의 항원결합 친화도를 비교한 결과, 본 발명의 HBV 표면항원 프리-S1에 대한 생성 단일클론형체 KR127에 의한 인간화 항체 KR127은 생성 단일클론형체 KR127과 유사한 항원결합능력을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

이하 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

#### <실시예 1> 인간화 중쇄 유전자의 제조

인간화 중쇄 가변영역을 제조하기 위하여 우선, 생성 단일클론형체 KR127의 중쇄 가변영역 유전자와 아미노산 서열이 가장 유사한 사람항체 DP12를 전뱅크 데이터베이스로부터 선발하고, 상기 KR127의 중쇄 가변영역과 DP12 항체의 중쇄 가변영역의 아미노산 서열 및 염기 서열을 비교하여 이를 근거로 첫 번째 인간화 중쇄 KR127HOv(HZI)를 고안한 후, 고안된 첫 번째 인간화 중쇄를 개선하여 두 번째 인간화 경색 KR127HOv(HZII)를 고안하였다.

구체적으로, 인간화 중쇄 가변영역 유전자 KR127HOv(HZI)는 인간화 항체에서 항체의 구조에 영향을 줄것으로 추정된 몇개의 생성 프레임워크 아미노산 잔기와 COR1.3 및 CDR2 일부를 사람항체 중쇄 가변영역 DP7에 이식시켜 상기 KR127HOv(HZI)를 제조한 다음 이로부터 하기 PCR에 의하여 제조하였다.

중쇄의 분비에 필요한 중쇄 리더 시퀀스와 사람항체 중쇄 불변영역 유전자는 pRC/CMV-HC-His(KCTC0022BP)로부터 합성하였다.

상기 리더 시퀀스, 인간화 중쇄 가변영역 유전자 KR127HOv(HZII), 인간화 중쇄 불변영역 유전자는 pRC/CMV-HC-His(KCTC0022BP)로부터 합성하였다.

PCR에 사용한 시발체를 서열 1 내지 서열 12에 기술하였다.

PCR 반응조건은 94 °C에서 1분, 55 °C에서 1분, 72 °C에서 1분으로 Taq DNA 중합효소 (polymerase)를 사용하여 30회 수행하였다. 먼저, 서열 1과 서열 2, 서열 3과 서열 4, 서열 5와 서열 6, 서열 7과 서열 8, 서열 9와 서열 10, 서열 11과 서열 12의 시발체를 사용하여 얻어진 DNA 단본들을 서열 1과 서열 2(113bp), 서열 3과 서열 4(96bp), 서열 5와 서열 6(120bp), 서열 7과 서열 8(76bp), 서열 9와 서열 10(87bp)의 시발체를 사용하여 얻어진 DNA 단본들을 이별하여 서열 1과 서열 10의 시발체로 제조한 PCR하여 연결하였고, 상기 합성된 단본(431bp)을 서열 11과 서열 12의 시발체를 사용하여 합성된 DNA 단본(1015bp)을 서열 1과 서열 12의 시발체를 사용하여 연결하였다.

최종적으로 합성된 인간화 항체 중쇄 유전자 (약 1431bp)를 제한효소 EcoRI와 제한효소 Sall로 잘라 pBluescript SK(+)에 클로닝하여 pKR127KC라 명명하였다. 제조된 인간화 항체 중쇄 유전자의 염기서열은 DNA 시퀀싱(Sequencing)에 의해 확인하였다.

#### <실시예 2> 인간화 경색 유전자의 제조

인간화 경쇄 가변영역을 제조하기 위하여 우선, KR127의 가변영역 유전자와 아미노산 서열이 가장 유사한 사람황체 OPK12를 진링크 데이터베이스로부터 선발하고, 삼기 KR127의 경쇄, 가변영역과 OPK12 황체의 경쇄 가변영역의 아미노산 서열 및 염기 서열을 비교하여 이를 근거로 첫 번째 인간화 경쇄 유전자 KR127KCV(HzI)를 고안한 후, 고안된 첫 번째 인간화 경쇄를 개선하여 두 번째 인간화 경쇄 유전자 KR127KCV(HzII)를 고안하였다.

두 번째 인간화 경쇄는 생쥐 황체의 CDR1,2,3와 몇 개의 FR 전기를 사람 황체 경쇄에 이식시킨 것이다.

경쇄의 분비에 필요한 경쇄 리더 시퀀스와 사람황체 경쇄 불변영역 유전자는 pKC-dhfr-HuS(KCTC 02308P)로부터 합성하였다.

삼기 리더 시퀀스, 인간화 경쇄 가변영역 유전자 KR127KCV(HzII), 인간화 경쇄 불변영역 유전자는 제조한 PCR에 의하여 연결하여 최종적으로 인간화 경쇄 유전자 KR127KCV(HzII)를 제조하였다(도 4 참조).

PCR에 이용한 시발체를 서울 13 부터 서울 18에 기술하였다.

PCR 조건은 94 °C에서 1분, 55 °C에서 1분, 72 °C에서 1분으로 30회 수행하였다. 먼저 서울 13과 서울 14, 서울 15와 서울 16, 서울 17과 서울 19의 시발체를 사용하여 얻어진 DNA 단편들 중 서울 13과 서울 14(101bp), 서울 15와 서울 16 (159bp)의 시발체를 사용하여 얻어진 DNA 단편들을 어울림하여 서울 13과 서울 16의 시발체로 제조한 PCR에 연결하여 합성된 단편 (246bp)을 서울 17과 서울 18의 시발체로 합성된 DNA 단편 (515bp)과 서울 9와 서울 18의 시발체로 연결하여 최종적으로 인간화 황체 경쇄 유전자 (736bp)를 합성하였다.

합성된 인간화 황체 유전자를 제한효소 HindIII와 제한효소 Sall로 양끝을 끌라 pBluescript SK(+)에 넣고 편 pHR127KCV 명명하였다. 합성된 인간화 황체 경쇄 유전자의 염기서열은 DNA 시퀀싱에 의해 확인하였다.

#### <실시예 3> 인간화 경쇄 발현 플라스미드의 제조

플라스미드 pHR127HC를 제한효소 Sall로 자른 후 클레나우 (Klenow)효소로 끝을 불란트 (blunt)하게 만든 다음, 제한효소 NotI으로 다시 자른 후 인간화 경쇄 유전자를 분리하였다.

한편 pRO/CMV (Invitrogen사 제품)를 제한효소 XbaI로 자르고 클레나우 효소로 끝을 불란트하게 만든 다음, 제한효소 NotI으로 다시 자른 뒤 벡터를 분리하였다.

분리된 벡터에 삼기의 인간화 경쇄 유전자를 연결하여 인간화 경쇄 발현 벡터 pCMV-HR127HC를 제작하였다. 제작된 인간화 경쇄 발현 벡터 pCMV-HR127HC는 KCTC에 기탁하였고 (기탁번호:KCTC05318P), 완성된 벡터는 도 5a에 나타내었다.

#### <실시예 4> 인간화 경쇄 발현 플라스미드의 제조

플라스미드 pHR359KC를 제한효소 HindIII와 Apal으로 잘라 인간화 경쇄 유전자를 분리하고 이를 pCMV-dhfr (KCTC0571P)의 HindIII와 Apal 위치에 삽입하여 인간화 경쇄 발현 벡터 pKC-dhfr-HR127을 제작하였다.

제작된 인간화 경쇄 발현 벡터 pKC-dhfr-HR127을 KCTC에 기탁하였고 (기탁번호:KCTC05296P), 완성된 벡터는 도 5b에 나타내었다.

#### <실시예 5> 인간화 황체의 COS7 세포에서 발현

송아지질청이 10 % 혈가된 DMEM 배양배지 (GIBCO사 제품)에서 37°C, 5% 탄산가스를 유지하면서 COS7 세포를 계대배양하였다. 삼기 세포를 100mm 접시에  $1 \times 10^6$  개 접종하고 37°C에서 하룻밤 동안 배양하였다.

한편, 삼기 실시예 3과 실시예 4에서 얻은 발현 벡터 pCMV-HR127HC와 pKC-dhfr-HR127의 5'端을 각각 OPTI MEM I 800μl로 회석하고 50μl의 리포택티린 (Lipofectamine, GIBCO사 제품)도 OPTI MEM I 800μl로 회석하였다. 삼기 혼합물을 15ml 튜브에서 혼합한 후 15분 이상 실온에서 방지하였다. 혼합물을 방지하는 사이에 전날 접종해둔 COS7 세포를 OPTI MEM I (GIBCO사 제품)으로 2회 세척하였다.

DNA-리프팅단인 혼합물을 6.4 μl의 OPTI MEM I를 첨가하고 혼합한 후 삼기에서 세척한 COS7 세포 위에 균일하게 부어 주었다. 탄산가스 흥은기에서 72시간 동안 배양한 후, 배양액의 상층액을 모아 초원심 여과장지 (Ultrafiltration Kit)로 농축한 다음, 항-인간 황체 (anti-human IgG)와 항-인간 황체-HRP 컨쥬게이트(conjugate)를 이용한 샌드위치 멀리자 (Sandwich ELISA)에 의하여 황체의 농도를 측정하였다.

#### <실시예 6> 인간화 황체의 HBV 표면항원 프리-S1에 대한 결합능

본 연구실에서 제조한 HBV의 표면항원 프리-S1 (아미노산 1-56)를 마이크로플레이트의 각well에 1 μg씩 코팅하고, 실시예 5에서 경량화 황체의 농도에 기초하여 황체 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 20, 50 ng/well을 첨가한 후, 항-인간 황체 (Fc specific)에 항고추출이 과산화효소(horseradish peroxidase)가 결합 (conjugation)된 황체를 2차 황체로 결합시키는 간접 염리자를 수행하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조군으로는 경량화 KR127을 사용하였으며, 그 결과는 표 1에 나타내었다. KR127의 황체결합능을 분석할 때에는 항-생쥐 황체 (Fc specific)에 항고추출이 과산화효소(horseradish peroxidase)가 결합 (conjugation)된 황체를 2차 황체로 사용하였다.

KR127과 H2KR127의 HBV 표면항원 프리-S1에 대한 결합능 (흡광도, 492nm)

첨가량 (ng)	0	0.25	0.5	1	2	3	4	5	7.5	10	20	40
KR127	0.09	0.12	0.15	0.20	0.30	0.36	0.43	0.54	0.60	0.80	1.16	1.64
H2KR127	0.09	0.12	0.17	0.26	0.35	0.43	0.60	0.71	0.79	1.12	1.48	1.77

## &lt;실시에 7&gt; 인간화 항체의 항원결합 친화도

인간화 항체의 HBV 프리-S1 항원에 대한 친화도를 알아보기 위하여 경쟁적 엘리자 방법 (Competitive ELISA; Ryu et al., J. Med. Virol., 52, 226, 1997)을 이용하여 항원 결합친화도를 측정하였다.

먼저,  $1 \times 10^{-7}$  ~  $1 \times 10^{-12}$  M 농도의 HBV 항원에 대하여 각각 COS7에서 생산한 항체와 대조군인 KR127 항체를 37°C에서 2시간 동안 결합시킨 다음, 그 반응물을 96隽에 코팅되어 있는 항원과 결합시켰다.

상기 결과로부터 HBV와 결합한 항체의 양을 최종적으로 측정하여 그 결과를 도 6에 나타내었다. KR127과 H2KR127의 항원 결합친화도를 비교해 본 결과, KR127은 약  $7 \times 10^{-11}$  M, H2KR127은  $1 \times 10^{-11}$  M로 인간화 항체의 항원 결합친화도가 약간 높게 나타났음을 확인하였다(도 6 참조).

## 발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 HBV 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체는 생쥐 단일클론항체와 유사한 항원결합능을 나타내는 반면, 생쥐 단일클론항체보다 아미노산 잔기가 더 인간화되어 인체내에서의 면역유발능이 현저히 감소되었으므로, HBV 감염의 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

## [서열목록]

서열번호 : 1

서열의 길이 : 26

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(율리고 뉴클레오파이드)

## 서열 1

5'-GAGAATTCAC ATTCACCGATG TACTTG-3'

## [서열목록]

서열번호 : 2

서열의 길이 : 27

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(율리고 뉴클레오파이드)

## 서열 2

5'-GGCCCCAGGC TTCAACCACTT CAGCTCC-3'

## [서열목록]

서열번호 : 3

서열의 길이 : 18

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(울리고 뉴클레오타이드)

#### 서열 3

5'-GTGAAGCCTG GGGCCTCA-3'

##### [서열목록]

서열번호 : 4

서열의 길이 : 27

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(울리고 뉴클레오타이드)

#### 서열 4

5'-AGAACTACTG AATGCGTAGC CAGAAGC-3'

##### [서열목록]

서열번호 : 5

서열의 길이 : 27

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(울리고 뉴클레오타이드)

#### 서열 5

5'-GCATTCAGTA GTTCTTGGAT GAACTGG-3'

##### [서열목록]

서열번호 : 6

서열의 길이 : 27

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(울리고 뉴클레오타이드)

#### 서열 6

5'-AATCCGTCCA ATCCACTCAA GACCCTG-3'

##### [서열목록]

서열번호 : 7

서열의 길이 : 21

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(율리고 뉴클레오파이드)

#### 서열 7

5'-TGGATTGGAC GGATTTATCC T-3'

[서열목록]

서열번호 : 8

서열의 길이 : 39

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(율리고 뉴클레오파이드)

#### 서열 8

5'-GGATTTCGTCT GCAGTCAGTG TGGCCTTGCC CTGGAACTT-3'

[서열목록]

서열번호 : 9

서열의 길이 : 39

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(율리고 뉴클레오파이드)

#### 서열 9

5'-ACTGCAGACA AATCCACGAG CACAGCCTAC ATGGAGCTC-3'

[서열목록]

서열번호 : 10

서열의 길이 : 33

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(율리고 뉴클레오파이드)

#### 서열 10

5'-GTCGTACTCT CTTCACAGA AATAGACCGC CGT-3'

[서열목록]

서열번호 : 11

서열의 길이 : 33

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(울리고 뉴클레오파이드)

서열 11

5'-GCAAGAGAGT ACGACGAGGC TTACTGGGC CAA-3'

[서열목록]

서열번호 : 12

서열의 길이 : 26

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(울리고 뉴클레오파이드)

서열 12

5'-CGGTCGACTC ATTTACCGGG AGACAG-3'

[서열목록]

서열번호 : 13

서열의 길이 : 26

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(울리고 뉴클레오파이드)

서열 13

5'-CAAAGCTTGG AAGCAAGATG GATTCA-3'

[서열목록]

서열번호 : 14

서열의 길이 : 36

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(울리고 뉴클레오파이드)

서열 14

5'-TGGAGTTTGG GTCATCAAGA TATCCCCACA GGTACC-3'

[서열목록]

서열번호 : 15

서열의 길이 : 48

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(울리고 뉴클레오파이드)

서열 15

5'-ATGACCCAAA CTCCACTTTC TTTGTCGGTT ACCCCTGGAC AACCAAGCC-3'

[서열목록]

서열번호 : 16

서열의 길이 : 39

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(울리고 뉴클레오파이드)

서열 16

5'-CACAGATAG ATTAGGGCCT TTGGAGACTG GCCTGGCTT-3'

[서열목록]

서열번호 : 17

서열의 길이 : 39

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(울리고 뉴클레오파이드)

서열 17

5'-CTAATCTATC TGGTGTCTAA ACTGGACTCT GGAGTCCCT-3'

[서열목록]

서열번호 : 18

서열의 길이 : 17

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산(울리고 뉴클레오파이드)

서열 18

5'-GAAGTCGACC TAACACT-3'

## [서열목록]

서열번호 : 19  
 서열의 길이 : 115  
 서열의 험 : 아미노산  
 채의 수 : 1본체  
 형태 : 직쇄상  
 서열의 종류 : 단백질

## 서열 19

Gln Val Gin Leu Val Gin Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala	16
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser	32
Trp Met Asn Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Gin Gly Leu Glu Trp Ile	48
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	64
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	96
Ala Arg Glu Tyr Asp Glu Ala Tyr Trp Gly Gin Gly Thr Leu Val Thr	112
Val Ser Ser	115

## [서열목록]

서열번호 : 20  
 서열의 길이 : 113  
 서열의 험 : 아미노산  
 채의 수 : 1본체  
 형태 : 직쇄상  
 서열의 종류 : 단백질

## 서울 20

Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly	16
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser	32
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	48
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro	64
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly	96
Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	112
Arg	113

## (57) 청구의 범위

## 청구항 1

서울 19의 아미노산 서열의 가변영역을 포함하는 인간화 중쇄로 된 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체.

## 청구항 2

서열 20의 아미노산 서열의 가변영역을 포함하는 인간화 경쇄로 된 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체.

## 청구항 3

제 1 항의 서울 19의 아미노산 서열의 가변영역을 포함하는 인간화 중쇄를 암호하는 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 중쇄 유전자.

## 청구항 4

제 2 항의 서울 20의 아미노산 서열의 가변영역을 포함하는 인간화 경쇄를 암호하는 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 경쇄 유전자.

## 청구항 5

제 3 항의 유전자를 포함하는 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체의 중쇄 발현 벡터 pCMV-HKR127HC (기록번호: KCTC0531BP).

## 청구항 6

제 4 항의 유전자를 포함하는 HBV의 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체의 경쇄발현 벡터 pKC-dhfr-HKR127 (기록번호: KCTC05296P).

## 청구항 7

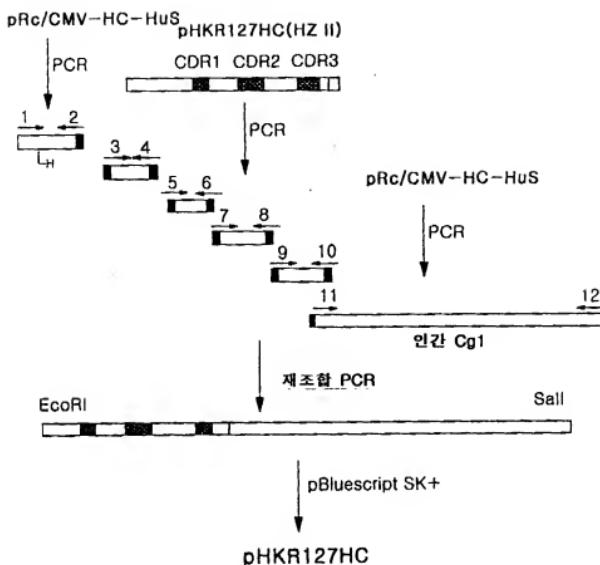
제 1 항 또는 제 2 항의 HBV 표면항원 프리-S1에 대한 인간화 항체를 HBV 감염의 예방과 B 형 만성간염의 치료에 사용하는 용도.

도면

521

KR127VH	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P		
D7	CAG	GTC	CAG	CTG	CGG	CAG	TCT	GGG	CCT	GA	GTC	GTG	AGG	CCT	42	
HZI	CAG	GTC	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GCT	GA	GTC	GTG	AGG	AGG	CCT	42
HZI	-	-	-	V	-	-	-	A	-	V	K	-	-	-	-	
	G	S	V	-	-	S	C	K	A	S	-	Y	A			
KR127VH	GGG	GCC	CA	TGG	AGG	ATT	TCC	GGG	ATG	GA	TCT	GGG	TAC	GGG		
D7	GGG	GCC	TCA	GTG	AGG	ATT	TCC	GGG	AGG	GA	TCT	GGG	TAC	ACC		
HZI	GGG	GCC	TCA	GTG	AGG	ATT	TCC	GGG	AAA	GCT	TCT	GGG	TAC	ACC		
HZI	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	F	S	S	S	N	M	N	W	V	K	Q	R	P	G		
KR127VH	TTC	AGT	AGT	TCT	TGG	AGG	AAC	TGG	GTG	AGG	CAG	AGG	CCT	GGG	126	
D7	TTC	ACC	AGG	TAC	TAT	AGT	CAC	TGG	GTG	CGA	CAG	GCC	CCT	GGG		
HZI	TTC	ACC	AGT	TAC	TGG	AGG	ATG	AAC	TGG	GTG	CGA	CAG	GCC	CCT	GGG	
HZI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	A	-	-		
	Q	G	L	E	W	I	R	I	Y	F	G	D	G			
KR127VH	CAG	GGT	CTT	GAC	TGG	ATT	GGG	CGG	ATT	TAT	CCT	GGG	GAT	GGG	168	
D7	CAG	GGG	CTT	GAC	TGG	ATT	GGG	ATA	CTC	AAC	CCT	AGT	GAT	GGT		
HZI	CAG	GGT	CTT	GAC	TGG	ATT	GGG	CGG	ATT	TAT	CCT	GGG	GAT	GGG		
HZI	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-		
	D	T	N	Y	N	G	K	F	K	G	K	A	T	L		
KR127VH	GAG	ACT	AAC	TAC	ATC	GGG	AGG	TTC	AGG	GCG	AGG	GCC	ACA	CTG	210	
D7	AGC	ACA	AGC	TAC	GCA	CAG	AGG	TTC	CAG	GCG	AGA	GTC	ACA	ATG		
HZI	GAT	ACT	AAC	TAC	GCA	CAG	AGG	TTC	CAG	GCG	AGA	GTC	ACA	ATG		
HZI	-	-	-	-	A	Q	-	-	Q	-	R	V	-	M		
HZI	-	-	-	-	A	Q	-	-	Q	-	-	-	-	-		
	T	A	D	K	S	S	S	T	A	Y	H	Q	L	S		
KR127VH	ACT	GCA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAG	CTG	AGC	252	
D7	ACC	AGG	AGC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCA	TAC	ATG	GAG	CTG	AGC		
HZI	ACT	GCA	GAC	AGC	TCC	AGC	AGC	ACA	GCA	TAC	ATG	GAG	CTG	AGC		
HZI	-	-	-	-	T	-	-	T	-	-	-	Y	-	-		
HZI	-	-	-	-	T	-	-	T	-	-	-	Y	-	-		
	S	L	T	S	V	D	S	A	V	Y	F	C	A	R		
KR127VH	AGC	CTG	ACC	TCT	GTG	GAC	TCT	GGG	GCG	TAT	TTC	TGT	GCA	AGA	294	
D7	AGC	CTG	AGG	TCT	GAC	AGC	GGG	GCG	TAT	TAC	TGT	GCA	AGA			
HZI	AGC	CTG	AGG	TCT	GAC	AGC	GGG	GCG	TAT	TAC	TGT	GCA	AGA			
HZI	-	-	-	-	R	-	-	T	-	-	-	Y	-	-		
HZI	-	-	-	-	R	-	-	T	-	-	-	Y	-	-		
	E	Y	D	E	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T		
KR127VH	GAG	TAC	GAC	GAG	GAC	TAC	TGG	GGG	CAA	GGG	ACT	CTG	GTC	ACT	336	
HZI	GAG	TAC	GAC	GAG	GAC	TAC	TGG	GGG	CAA	GGG	ACT	CTG	GTC	ACT		
HZI	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
HZI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	V	S	A													
KR127VH	GTC	TCT	GCA	345												
HZI	GTC	TCT	TCA													
HZI	-	-	S													
HZI	-	-	S													

도 22

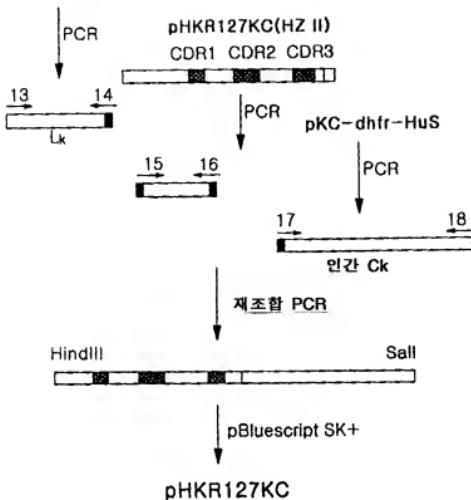


523

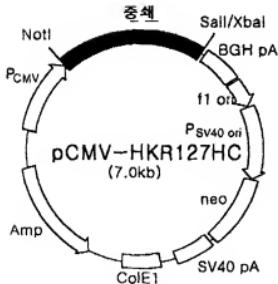
KR127VK	D	I	L	N	T	G	T	P	L	I	L	S	V	T		
DPK12	GAT	ATC	TTC	ATG	ATC	ACC	CAA	ACT	CCA	CTT	ATT	TTC	GCG	GTT	ACC	42
HZI	GAT	ATC	TTC	ATG	ATC	ACC	CAG	ACT	CCA	CTC	TCT	CTG	TCC	GTC	ACC	
HZI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HZI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
KR127VK	I	G	O	P	A	R	S	I	S	C	K	S	S	O	S	
DPK12	ATT	GGG	CAA	CCA	CCC	GCC	TCT	ATC	TCT	TGG	AAG	TCA	AGT	CAG	ACC	84
HZI	CCT	GGG	CAG	CGG	CCC	GCC	TCT	ATC	TCC	TGC	AMG	TCT	AGT	CAG	ACC	
HZI	CCT	GGG	CAA	CCA	CCC	GCC	TCT	ATC	TCT	TGG	AAG	TCA	AGT	CAG	ACC	
HZI	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HZI	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
KR127VK	L	L	S	N	G	K	T	Y	L	N	W	L	L			
DPK12	CTG	126														
HZI	CTG															
HZI	CTG															
HZI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
KR127VK	Q	R	F	G	G	Q	S	P	K	R	L	I	Y	L	V	
DPK12	CAG	AGG	CCA	GGC	CAG	TCT	CCA	AGG	GGC	CTA	ATC	TAT	CAG	GTC	168	
HZI	CAG	AGG	CCA	GGC	CAG	CCT	CCA	CAG	CTC	CTG	ATC	TAT	GAA	GTT		
HZI	CAG	AGG	CCA	GGC	CAG	CCT	CCA	CAG	CTC	CTG	ATC	TAT	GTC	GTC		
HZI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
KR127VK	S	K	L	D	S	G	V	P	D	R	F	T	G	S		
DPK12	TCT	CTG	210													
HZI	TCT	CTG														
HZI	TCT	CTG														
HZI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
KR127VK	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	I	R	V	E		
DPK12	GGA	TCA	GGA	ACA	GAT	TTT	ACA	CTG	AAA	ATC	ATC	AGA	GTC	GAG	252	
HZI	GGA	TCA	GGA	ACA	GAT	TTT	ACA	CTG	AAA	ATC	AGC	GCG	GTC	GAG		
HZI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
HZI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
KR127VK	A	E	D	G	V	Y	Y	C	V	O	G	T	R			
DPK12	GCT	CAG	GAT	TTC	GGA	GTT	FAT	TAC	TTC	GCG	GAG	ATC	ATC	ATC	ATC	294
HZI	GCT	CAG	GAT	TTC	GGA	GTT	FAT	TAC	TTC	GCG	GAG	ATC	ATC	ATC	ATC	
HZI	GCT	CAG	GAT	TTC	GGA	GTT	FAT	TAC	TGC	GTC	GAA	GTC	ACA	CAT		
HZI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
KR127VK	F	F	P	O	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	
DPK12	CTT	CCT	CAG	ACG	TTC	GGT	GGA	GCG	ACC	AMG	CTG	GAA	ATC	AAA	336	
HZI	CTT	CCT	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
HZI	CTT	CCT	CAG	ACG	TTC	GGT	GGA	GCG	ACC	AMG	GTC	GAA	ATC	AAA		
HZI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
HZI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
KR127VK	R															
HZI	CGG	339														
HZI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
HZI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

도 54

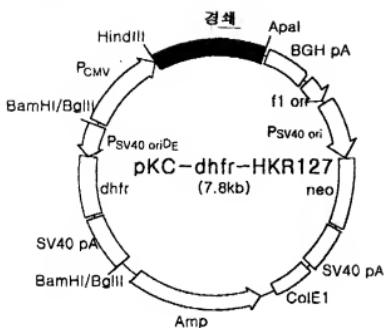
pKC-dhfr-HuS



도 55a



도면5b



도면6

